

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620060153309

UDC _____

厦门大学

博士学位论文

Menin 依赖于 cyclin B2 的抑癌机制的探讨

Study on the cyclinB2-dependent mechanism of menin in
suppressing in tumorigenesis

作者姓名: 吴 婷

指导教师姓名: 华先欣 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩时间: 2010 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(华先欣教授)课题(组)的研究成果,获得(NIH grants (R01-CA-100912 and R01-CA-113962 to XH), and a grant from American Diabetes Association (7-07-RA-60 to XH))课题(组)经费或实验室的资助,在(华先欣教授)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

2010年 4 月 27 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

2010 年 4 月 27 日

目录

摘要及关键词	1
第一章 实验步骤与方法	3
1 质粒	3
2 细胞培养	4
3 免疫染色质沉淀	4
4 流式细胞分析	7
5 蛋白提取和蛋白免疫印迹 Western Blotting	8
6 RNA 提取和 RT-PCR	8
7 细胞免疫荧光染色	9
8 双荧光素酶检测启动子活性	10
9 逆转录病毒的包装和转染	10
10 慢病毒的包装和转染	11
11 石蜡组织切片的免疫组化	12
12 统计学分析	13
缩略词	13
第二章 前言	14
1 多发性内分泌肿瘤 1 型综合症	14
2 Menin 参与细胞周期的调控	15
3 Menin 调控基因转录	16
3.1 Menin 与转录因子相互作用调控基因转录	17
3.2 Menin 与 DNA 直接结合调控基因转录	17
3.3 Menin 影响组蛋白的修饰调控基因转录	18
4 抑癌基因 <i>Men1</i> 的突变	19
5 细胞周期与 cyclin B2	20
5.1 细胞周期的调控	20
5.2 Cyclin B 与细胞周期 G2/M 期的调控	21
6 Cyclin B2 的转录调控	21
第三章 实验结果	23
1 Menin 阻滞了细胞周期 G2/M 期的进程	23
2 Menin 抑制了周期蛋白 cyclin B2 的表达	28
3 抑制 cyclin B2 的表达降低了细胞周期 M 期的细胞数及减缓了细胞生长	29
4 Menin 抑制了 cyclin B2 启动子的活性	32
5 Menin 与 cyclin B2 启动子结合	34
6 Menin 干扰了 NF-Y, RNA 聚合酶 II 和 E2Fs 在 cyclin B2 启动子上的结合	36
7 Menin 影响了 cyclin B2 启动子上的组蛋白修饰	38
8 与 MEN1 疾病相关的突变体失去了阻滞细胞周期 G2/M 期进程及抑制 cyclin B2 表达的功能	42
9 MEN1 疾病相关的突变体无法有效的抑制组蛋白 H3 的乙酰化水平	47
10 具有 MEN1 的小鼠胰岛瘤中 cyclin B2 的表达量增高	49
第四章 实验讨论	51
参考文献	58
致谢	64

Catalog

Abstract and key words	1
Chapter 1 Experimental procedures and methods	3
1 Plasmids	3
2 Cell culture	4
3 Chromatin Chromatin Immunoprecipitation	4
4 Cell flow cytometry	7
5 Protein extraction and Western Blotting	8
6 RNA extraction and RT-PCR	8
7 Immunofluorescent staining	9
8 Dual Luciferase assay	10
9 Retrovirus package and transfection	10
10 Lentivirus package and transfection	11
11 Immunohistochemistry	12
12 Statistical Analysis	13
Abbreviation	13
Chapter 2 Introduction	14
1 Multiple Endocrine Neoplasia type 1	14
2 Menin in cell cycle regulation	15
3 Menin in gene transcription	16
3.1 Menin interacts with transcriptional factors	17
3.2 Menin directly binds to DNA	17
3.3 Menin affects histone modification	18
4 <i>Men1</i> mutation	19
5 Cell cycle and cyclin B2	20
5.1 Cell cycle	20
5.2 Cyclin B and G2/M transition	21
6 Transcriptional regulation of cyclin B2	21
Chapter 3 Results	23
1 Menin delays G2/M transition	23
2 Menin repress cyclin B2 expression	28
3 Cyclin B2 knockdown decreases the number of cells in M phase and reduces cell proliferation	29
4 Menin represses the cyclin B2 promoter activity	32
5 Menin associates with the <i>Ccnb2</i> promoter	34
6 Menin prevents NF-Y, E2Fs and RNA polymerase II from binding to the cyclin B2 promoter	36
7 Menin affects histone H3 modification at the cyclin B2 promoter	38
8 MEN1 disease-related menin point-mutants lose the function in arresting G2/M transition and repressing cyclin B2 expression	42
9 MEN1 disease-related menin point-mutants lose the function of reducing the level of acetylated histone H3 at the cyclin B2 promoter	47
10 Cyclin B2 is increased in the insulinoma of MEN1 mouse	49
Chapter 4 Discussion	51

Reference	58
Acknowledgement	64

厦门大学博士论文摘要库

摘要:

抑癌基因 **Men1** 的突变导致多发性内分泌 I 型肿瘤 (MEN1) 的发生, 其编码的蛋白为 menin。Menin 通过上调组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸 (H3K4) 的甲基化而上调了一些周期蛋白依赖激酶抑制剂从而抑制了细胞周期 G0/G1 到 S 期的进程。然而 menin 对于细胞周期另一个重要的调控点 G2/M 期的调控还不清楚。在该研究中我们发现 menin 阻滞了细胞周期 G2/M 期的进程, 并抑制了细胞周期蛋白 cyclin B2 的表达。Menin 与 cyclin B2 的启动子结合并下调启动子结合区域的组蛋白 H3 乙酰化水平, 组蛋白 H3 乙酰化是一个正向调控转录的组蛋白修饰的标志。敲除 menin 的小鼠 MEF 细胞中, cyclin B2 的表达量增高, cyclin B2 启动子上相应位点的组蛋白 H3 乙酰化水平也增高, 细胞周期 G2/M 期的进程也被加速。当用 shRNA 抑制细胞中 cyclin B2 的表达之后, 细胞中处于 M 期的细胞比例减少, 细胞生长受到抑制。进一步深入研究 menin 对 cyclin B2 转录抑制的机制, 我们发现 menin 阻碍了一些正向转录因子结合在 cyclin B2 启动子上, 如核因子 Y (NF-Y), E2 因子 (E2Fs) 和组蛋白乙酰基转移酶中的 CREB 结合蛋白 (CBP) 等。MEN1 疾病相关的 menin 突变体, A242V 和 L22R 失去了野生型 menin 的抑制 cyclin B2 表达和抑制细胞周期 G2/M 期进程的能力。并且两个突变体都失去了抑制 cyclin B2 启动子上组蛋白 H3 乙酰化水平的能力。综合以上研究我们认为 menin 通过抑制 cyclin B2 的表达而抑制了细胞周期 G2/M 期的进程以及抑制了细胞的生长, 我们的研究揭示了 menin 调控 cyclin B2 和抑制 MEN1 肿瘤发生的可能机制

关键词: 转录调控; 细胞周期 G2/M 期; menin; cyclin B2; 组蛋白修饰; 组蛋白 H3 乙酰化

Abstract:

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) results from mutations in tumor suppressor gene *Men1*, which encodes nuclear protein menin. Menin upregulates certain cyclin-dependent kinase inhibitors through increasing histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation and inhibits G0/G1 to S phase transition. However, little is known as to whether menin controls G2/M phase transition, another important cell cycle checkpoint. Here we show that menin expression delays G2/M phase transition and reduces expression of cyclin B2. Menin associates with the promoter of cyclin B2 and reduces histone H3 acetylation, a positive chromatin marker for gene transcription, at the cyclin B2 locus. Moreover, *Men1* ablation leads to an increase in cyclin B2 expression, histone H3 acetylation at the cyclin B2 locus, and G2/M transition. In contrast, knockdown of cyclin B2 diminishes the number of cells at M phase and reduces cell proliferation. Further, menin interferes with binding of certain positive transcriptional regulators, such as nuclear factor Y (NF-Y), E2 factors (E2Fs), and histone acetyltransferase CREB binding protein (CBP) to the *Ccnb2* locus. Notably, MEN1 disease-related mutations, A242V and L22R, abrogate the ability of menin to repress cyclin B2 expression and G2/M transition. Both of the mutants fail to reduce the acetylated level of the *Ccnb2* locus. Together, these results suggest that menin-mediated repression of cyclin B2 is crucial for inhibiting G2/M transition and cell proliferation through a previously unrecognized molecular mechanism for menin-induced suppression of MEN1 tumorigenesis.

Key words: transcriptional regulation; cell cycle G2/M; menin; cyclin B2; histone modification; acetylated histone H3

第一章. 实验步骤与方法:

1. 质粒

1.1. pMX-menin-puro, pMX-meninA242V-puro 和 pMX-meninL22R-puro 为实验室保存的质粒, 其构建方法参见本实验室发表的文献[1-3]。将 PCR 扩增的人的 menin 的 cDNA (U93236) 插入到 pMX-puro 质粒上的 BamH I /Not I 位点, 构建了 pMX-menin-puro; 点突变体 pMX-meninA242V-puro 和 pMX-meninL22R-puro 的构建以 pMX-menin-puro 为模板, 采用 QuickChange site-directed mutagenesis kit 试剂盒构建突变体。构建的质粒序列经过测序验证。

1.2. 四对 cyclin B2 shRNA 购于 Open Biosystems (商品号: RMM4534, Huntsville, AL)。其 cyclin B2 shRNA 构建于 PLK0.1 质粒上, 序列如下所示:

sh1-CCGGGCTTCTCAGATCCTGTATGTACTCGAGTACATACAGGATCTGAGAAGCTTTTGTG;

Sense Antisense

sh2-CCGGCTCTGCAAGATCGAGGACATACTCGAGTATGTCCTCGATCTTGCAGAGTTTTTGTG;

Sense Antisense

sh3-CCGGGCAGCAGTATTACACAGGCTACTCGAGTAGCCTGTGTAATACTGCTGTTTTTGTG;

Sense Antisense

sh4-CCGGGATGTTGAACAGCACACTTTACTCGAGTAAAGTGTGCTGTTCAACATCTTTTTGTG.

Sense Antisense

1.3. 构建在含有荧光素酶报告基因的 pGL3 质粒上的野生型和突变的 cyclin B2 启动子均由德国 Leipzig 大学的 Kurt Engeland 教授[4]赠送。分别为:

pGL3-cyclin B2-wt-Luc;

pGL3-cyclin B2-3 CCAAT mut-Luc; (CCAAT 突变为 TTACT)

pGL3-cyclin B2-CDE mut-Luc; (GGCGC 突变为 ATTAC)

pGL3-cyclin B2-CHR mut-Luc; (TTTGAA 突变为 TGCATA)

2. 细胞培养

2.1. 使用含 10%胎牛血清 (Gemini) 的细胞培养基 Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM, Gibico), 加入 100 units/ml 青链霉素 (GIBCO 15140) 培养细胞。

2.2. *MenI*^{-/-} MEF 细胞 (menin 缺失的 MEF 细胞) 和 *MenI*^{+/+} MEF 细胞 (menin 过表达的 MEF 细胞) 的建立参见本实验室发表的文献[5]。

2.3. 分别转染 pMX 对照空载体, 野生型 menin 和突变体 A242V, L22R 的 *MenI*^{-/-} MEF 细胞, 分别对应文章中所指的 Vector, Menin, A242V, L22R 这四种细胞。采用逆转录病毒转染的方法将 pMX-puro, pMX-menin-puro, pMX-meninA242V-puro 和 pMX-meninL22R-puro 分别导入 *MenI*^{-/-} MEF 细胞, 实验步骤详见后面逆转录病毒的包装和转染。

2.4. 细胞生长曲线: 在第 0 天的时候, 将细胞以 5×10^4 的密度接种在 6 孔板 (Corning) 的细胞培养板中, 每个样品平行接种三个, 在第 2 天, 第 4 天和第 6 天的时候分别用胰酶 (0.25% trypsin-EDTA, Gibco) 消化细胞, 于细胞计数板上计数。

3. 免疫染色质沉淀 (ChIP, Chromatin Immunoprecipitation): 使用 ChIP 试剂盒 (QuickChIP™, IMGENEX Corporation, San Diego, CA), 按照试剂盒中说明书的步骤进行操作。

3.1. 实验步骤

第 1 天:

1. 获得 5×10^6 细胞于 10 厘米的细胞培养板, 弃掉细胞培养基;
2. 加入 10ml 的含 1% 甲醛的培养基, 在 37℃ 交联 10 分钟;
3. 加入 1ml 10× 甘氨酸, 室温孵育 5 分钟, 终止交联反应;
4. 弃掉培养基;
5. 加入 10ml 预冷的 PBS 洗 2 次;

6. 加入1ml 预冷的PBS（含有PMSF和PIC蛋白抑制剂）；
7. 用细胞刮刀将细胞刮下收集到离心管中；
8. 以1200rpm在4℃离心5分钟；
9. 弃上清，在细胞沉淀中加入1mlSDS裂解液（含有PMSF和PIC蛋白抑制剂）；
10. 冰上裂解10分钟；
11. 超声破碎细胞，将DNA打成200bp至1000bp的片段；
12. 以15000rpm在4℃离心10分钟；
13. 将上清转移至另一个干净的离心管中；
14. 取200 μ l上清，加入800 μ l的ChIP Dilution Buffer（含PIC蛋白抑制剂）；
15. 加入75 μ l的Salmon Sperm DNA/Protein G Agarose，在4℃缓慢旋转30分钟，以除去非特异结合的物质；
16. 以1200rpm离心1分钟，收集上清；
17. 取10%的上清预留作为“Input”，余下的上清中加入4 μ gChIP级的目标抗体；
18. 缓慢旋转，在4℃孵育过夜；

第2天：

19. 加入60 μ l的Salmon Sperm DNA/Protein G Agarose在4℃缓慢旋转1小时，以结合抗体/抗原/DNA复合物；
20. 以1200rpm离心1分钟，弃掉上清；
21. 以Buffer A, B, C, D分别清洗沉淀符合物；
22. 加入500 μ l洗脱液将抗体/抗原/DNA复合物洗脱下来，同时在“Input”中加入终体积为500 μ l的洗脱液；
23. 每管中加入20 μ l的5M NaCl，65℃水浴中孵育过夜，使DNA和蛋白逆交联；

第3天：

24. 加入1 μ lRNase A，在37℃水浴中孵育30分钟；

25. 加入10 μ l 0.5M EDTA, 20 μ l 1M Tris-HCl, pH6.5 和2 μ l 10mg/ml蛋白酶K, 在45℃水浴中孵育1小时;

26. 酚/氯仿抽提和纯化ChIP DNA, 用50 μ l 无菌水溶解;

27. 以ChIP DNA为模板, 使用试剂盒SYBR Green PCR kit (Qiagen)进行实时定量PCR (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems), 每个样本平行上三个样。

3.2. ChIP实验中所用到的抗体:

anti-menin (BL342; Bethyl Laboratory), anti-acetylated histone H3 (17-615, Millipore), anti-trimethyl-histone H3K4 (17-614, Millipore), anti-histone H3 (ab1791, Abcam), anti-HDAC3 (ab7030, Abcam), anti-E2F2 (sc-633, Santa Cruz), anti-E2F3 (sc-879, Santa Cruz), anti-polymerase II (MMS-126R, Covance), anti-NF-YB (sc-13045, Santa Cruz), anti-CBP (sc-369, Santa Cruz), anti-IgG (ab46540-1, Abcam)。

3.3. ChIP实验中所用到的4对cyclin B2启动子的引物和1对Hoxa9启动子的引物:

Cyclin B2-P1:

5' -GAAATGTCAGATTTGGGCGAAGGG-3' 和 5' -AGTGCCAGCAGAACGACTTGAGAT-3'

Cyclin B2-P2:

5' -AGCCAGCCAATCAACGTGCAGAAA-3' 和 5' -TGACGCACTATTGGGTAGACGCAC-3'

Cyclin B2-P3:

5' -TCTACCCAATAGTGCCTCAGC-3' 和 5' -AAGTGCGGACGAGGCACA-3'

Cyclin B2-P4:

5' -ATTCCTGTTACCACTCAGGGCTGT-3' 和 5' -TTGGCCAGGAAGGCAGTATGAAGA-3'

Hoxa9-P:

5' -CGGGTACTGGGCTTATTTCA-3' and 5' -CCAAAAGGGGGAAAATTCAT-3'

4. 流式细胞分析

1. 第0天, 将细胞以 5×10^5 的密度接种在10厘米的细胞培养板 (Corning) 中, 在37℃细胞培养箱中培养48小时;
2. 第2天, 在培养基中加入BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate, Sigma) 使其终浓度为10 μ M, 在37℃细胞培养箱中培养30分钟;
3. 胰酶消化细胞, 离心收集细胞;
4. 用含1%BAS的PBS 洗细胞2次, 离心弃上清;
5. 用200 μ l 预冷的PBS 重悬细胞;
6. 预先在15ml离心管中放入3 ml预冷的70% 乙醇, 将细胞悬液逐滴加入, 将细胞放在-20℃冰箱固定过夜;
7. 第3天, 离心弃掉乙醇, 用漩涡振荡器将细胞沉淀打散;
8. 在细胞沉淀中缓慢加入1ml的含0.5%的2N HCL, 同时在漩涡振荡器振荡混匀;
9. 室温孵育30分钟, 使DNA变性成为单链;
10. 离心弃掉盐酸, 将细胞沉淀重悬在1ml的0.1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, pH8.5溶液中, 以中和盐酸;
11. 离心弃上清, 将细胞沉淀重悬在500 μ l 含有0.5% Tween 20, 1% BSA 的PBS 中, 调整细胞密度为 1×10^6 细胞;
12. 加入1 μ l的抗BrdU抗体 (Anti-BrdU, Alexa Fluor 488 conjugate, Invitrogen, A21303), 在室温下避光孵育30分钟;
13. 离心弃抗体, 用0.5ml含0.5% Tween 20和1% BSA的PBS洗一次;
14. 离心弃上清, 将细胞悬在0.5ml含5 μ g/mlPI (propidium iodide, P4864, Sigma)的PBS中, 滤膜过滤细胞使其成为单细胞悬液;
15. 用流式细胞仪BD FACS Calibur™ Flow Cytometer分析, 用Cell Quest Pro software软件分析数据。

5. 蛋白提取和蛋白免疫印迹Western Blotting

1. 收集细胞，用RIPA (R0278, Sigma) 裂解液裂解细胞；
2. 在冰上裂解1小时；
3. 以15000rpm离心15分钟，收集上清；
4. 用试剂盒测蛋白浓度；
5. 加入4×上样缓冲液LDS Sample Buffer (NP0007, Invitrogen NuPAGE)；
6. 在100℃金属浴中加热10分钟；
7. 以15000rpm离心5分钟，取20μl上清加样于4-12% Bis-Tris Gel (NP0321, Invitrogen NuPAGE)进行电泳，100V电压，120分钟；
8. 电泳结束后进行转膜，采用0.2μm的PVDF膜 (LC2002, Invitrogen)，使用150mA，转膜90分钟；
9. 转膜结束后用丽春红进行染色确定转膜效果和蛋白上样量是否一致；
10. 用10%脱脂奶粉的PBST (含0.1%Tween20的PBS) 进行封闭，室温2小时；
11. 用封闭液稀释一抗，在4℃孵育过夜；
12. 弃一抗，用PBST清洗三次，每次10分钟；
13. 与二抗在室温下孵育1小时，PBST清洗三次，每次10分钟；
14. 用ECL试剂盒 (RPN2106, GE) 显色，用X光片曝光和显影。
15. 所用的抗体如下：

anti-β-actin (Sigma); anti-menin (BL342, Bethyl Laboratory); anti-cyclin B2 (sc-22776, Santa Cruz); Goat anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio-RAD, 170-6516); Goat anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio-RAD, 170-6515)。

6. RNA 提取和 RT-PCR

1. 收集细胞，用TRIzol (Invitrogen) 裂解细胞；
2. 室温孵育5分钟；

3. 每1mlTRIzol中加入0.2ml氯仿，激烈振荡15秒，室温孵育3分钟；
4. 在4℃，以12000rpm离心5分钟；
5. 吸取水相转移到另一个干净的eppendorf管中；
6. 加入 1 倍体积的 70%乙醇，混匀；
7. 采用 Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) 提取 RNA；
8. 用 Rnase-free 的水溶解 RNA；
9. 以 1 μ gRNA 为模板，以 SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR 的试剂盒 (18080-051, Invitrogen)，将 RNA 逆转录成第一条链的 cDNA；
10. 以第一条链的 cDNA 为模板，采用试剂盒 SYBR Green PCR kit (Qiagen) 进行实时定量 PCR (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems)，每个样本平行上三个样，以 GAPDH 为内参；
11. Cyclin B2 的引物序列如下：
上游引物：5' -GCTCTGCCCACCAAAGTGACAAAT-3'
下游引物：5' -TCGATCTTGCAGAGCAGAGCATCA-3'。

7. 细胞免疫荧光染色

1. 第0天，将细胞以 1.5×10^4 的密度接种在预先防入玻片的24孔板的细胞培养板 (Corning) 中，在37℃细胞培养箱中培养48小时；
2. 第2天，吸去培养基，用PBS轻轻润洗1遍，吸去PBS；
3. 加入预冷的pH7.4的PBS配制的4%paraformaldehyde (15710, Electron Microscopy Sciences) 固定细胞，室温15分钟；
4. 吸去固定液，用PBS洗两次，每次5分钟；
5. 加入含 0.25%Triton X-100 的 PBS 通透细胞，室温 10 分钟；
6. PBS 洗 3 次，每次 5 分钟；
7. 加入含有 10%羊血清的 PBST 封闭，室温 30 分钟；

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库